315—318

28434(14)

动 物 学 研 究 1997, 18 (3): 315—318 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

小牛碱性磷酸酶同工酶的一些特性

秦达明 沈秋姑 王兴金
(江西教育学院生物系 生化教研室 南昌 330029) (江西农业大学牧医系生化教研室 南昌)

S823, S852.2

A **摘要** 我们用正丁醇抽提，经SephadexG-100凝胶过滤和DEAE-纤维素柱层析两步纯化，得到了比活性增大40倍和PAGE纯的牛AKP同工酶。对各AKP同工酶分别进行酶活性、电泳迁移率(*Rf*值)、热抑制、尿素抑制、组织特异性抑制实验，以鉴别每种同工酶的特性。实验结果表明：①各同工酶 *Rf*值，肝同工酶＞骨同工酶＞小肠同工酶；②经56℃加热10 min，只有骨同工酶完全失活，而肠同工酶对热是稳定的；③尿素强烈地抑制骨同工酶活性；肠同工酶对尿素是稳定的；④组织特异性抑制剂苯丙氨酸强烈抑制肠AKP活性。

牛， **关键词** 碱性磷酸酶同工酶，电泳迁移率，热抑制，尿素抑制，组织特异性抑制 特性

碱性磷酸酯酶[正磷酸单酯磷酸酶(E, C3, 1, 3, 1 AKP or Alp)]是一类多型性酶，它们的一些功能目前仍不甚清楚。动物血清AKP指标已用于临床诊断。80年代起，在畜牧业上人们开始寻求AKP作为畜禽肉、奶、蛋、毛等产量的种质指标。如Pete-roson(1986)提出血清AKP能作为黑白花牛产奶量、乳脂含量的可靠指标；陆曼珠等(1985)证实牛血清AKP的活性与牛产奶量之间有某种相关关系。但直到目前，这类工作都是应用血清AKP总活性，而事实上动物血清AKP中只有某种或几种AKP同工酶对动物种群或个体的生理及生产性能有着显著的相关性。因此，血清AKP特征性同工酶谱才是最灵敏的指标。我们对牛AKP各同工酶性质进行研究，目的就在于为牛血清中各AKP特征性同工酶谱的确定提供准确依据，亦为生产及科研实践打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黑白花小牛产于市郊畜牧场。SephadexG-100为瑞典Pharmacia产品；DEAE-纤维素为上海试剂二厂分装；对硝基苯酚磷酸二钠、对硝基苯酚、β-萘磷酸钠均为德国E. Merck产品；坚牢兰RR(Fast blue RR)为FluKa产品；考马斯亮兰、聚乙二醇(20 kD)进口分装；Ampholine、53 W uv/vis、pH 2-酸度计、721分光光度计、全套自动接收记录装置、冰冻高速离心机、高精度恒温水浴箱等均为国产。

1.2 方法

1.2.1 AKP活性测定基本按Woodroofe等(1989)使用的PHPP法，并把每分钟水解出

本文1996年1月16日收到，同年7月1日修回

1 μmol / L 对硝基酚规定为一个酶活性单位。由于纯酶活性较高，故把对硝酸酚磷酸的浓度提高到 5 mmol / L。具体方法是：5 mmol / L 的 0.1 mol / L pH10 碳酸–碳酸氢钠缓冲液对硝基酚磷酸二钠 1 ml+酶液 0.2 ml，37℃ 保温 25 min；加 0.02 mol / L NaOH 终止反应；405 nm 波长比色测定；查同样条件下作对硝基酚 OD_{405} 标准曲线，求出绝对量。

1.2.2　*Rf* 值测定、酶纯度鉴定均采用 Lee 的聚丙烯酰胺不连续圆盘电泳系统。凝胶 C = 5%，凝胶缓冲液为 Tris–HCl，pH8.9。电泳缓冲液为硼酸溶液，pH8.3。酶染色做了两点改进：①改底物 β 萘磷酸钠和染色剂坚牢兰 RR 水溶液为 0.3 mol / L pH9.3 Tris–HCl 缓冲液，以加强离子强度，减轻酶带扩散和创造酶作用最适 pH 环境；②把酶与底物保温、染色两步操作并为一步，即将底物、染色剂共溶于 Tris–HCl 缓冲液中，一次成功，这样即可省时间，又可避免换液操作时拉断胶条。具体操作是将 β–萘磷酸钠、$MgSO_4$、坚牢兰 RR 分别按 2、1、1 mg / ml 共溶于 0.3 mol / L 上述缓冲液，37℃ 5 min 酶带呈色即清晰可见

1.2.3　等电聚焦　方法基本参照乔克强(1975)改进法。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 4.5%，pH3—9 的 Ampholine，终浓度为 1.8%；泳毕后，胶条漂洗片刻作酶染色；同样条件下完成等电聚焦的两条胶条，从阳极向阴极端依次按每 0.5 cm 切断，每段加中性重蒸馏水 3 ml，研碎密封浸渍过液，测定并记录每段 pH 值。

1.2.4　蛋白质和酶染色采用考马斯亮兰常规操作法。蛋白染色带与同时电泳的酶染色带作对比。

2　结果与讨论

2.1　各同工酶蛋白染色与酶染色都得到了单一的色带，表明 PAGE 纯(酶的分离纯化已另文发表)。酶染色带如图 1。对稍有扩散的肠酶进一步做等电聚焦，仍得单一色带，如图 2

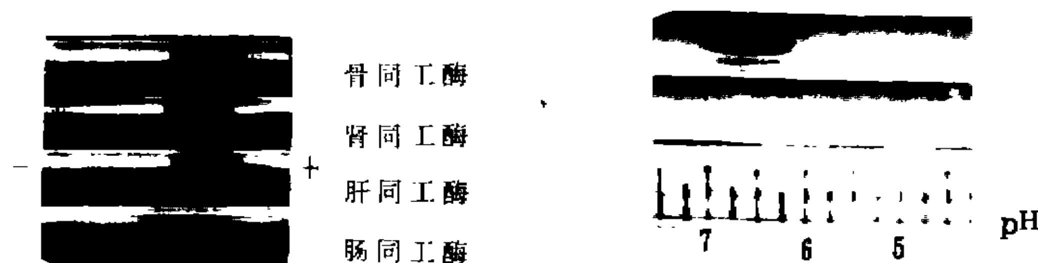


图1　在PAGE胶上的各同工酶样本图(每个胶条上只有 1 条同工酶带)

Fig. 1　The pure isoenzymes pattern on PAGE gel (every gel is characterized by single band)

图2　肠同工酶等电聚焦样本图(照片中只有1条酶带)

Fig. 2　Isoelectric focusing pattern photograph of purified intestine isenzyme (the photograph is characterized by single band)

2.2　对各同工酶电泳迁移率(*Rf* 值)进行比较，发现同工酶 *Rf* 值：肝 > 骨 > 小肠(正常的牛血清中只有肝、骨酶，偶有肠酶)。见表 1。

2.3　热抑制实验结果：56℃ (± 0.1℃)温育不同时间，立即冰水致冷，而后测定残留活

性，得到曲线（图 3）。

从图 3 看出：骨酶最不耐热，56℃经 5 min 几乎丧失全部活性；小肠酶比较耐热，56℃ 5 min 仍保留活性 38%；其次是肝酶耐热性也较强，56℃ 5 min 保留活性 30%，10 min 仍残留 5%的活性。这样，对于待测牛血清 AKP 同工酶谱标本，只需测定原活性、56℃ 5 min 及 10 min 共 3 次活性，就可判定其主要组成。

2.4 尿素抑制实验结果：各同工酶在不同浓度尿素溶液中 37℃ 下保温 1 h 后，测定酶活性，与处理前原活性进行比较，求得残留活性的百分率，见表 2。

从表 2 看出，尿素对骨酶的抑制能力最强，小肠酶对尿素相对不敏感。若选用适当浓度如 0.6 mol/L 的尿素处理血样 1 h，残留活性有助于判断血清酶谱组成。

2.5 组织(器官)特异性抑制实验结果：各同工酶经不同浓度 L-苯丙氨酸，37℃温育 1 h 后，测定残留活性，对原活性求出残留活性。

从表 3 可见，小肠 AKP 对 L-苯丙氨酸比较敏感，例如用 20 mmol/L L-苯丙氨酸处理，小肠 AKP 活性可降低 70%，而其他几种 AKP 活性降低约在 30%—40%。

表 1　各 AKP 同工酶电泳迁移率

Tab. 1　Electrophoretic mobility of AKP isoenzymes

同工酶	Rf 值 ± SD
肝同工酶	0.569 ± 0.012
肾同工酶	0.401 ± 0.029
肠同工酶	0.308 ± 0.060
骨同工酶	0.427 ± 0.018

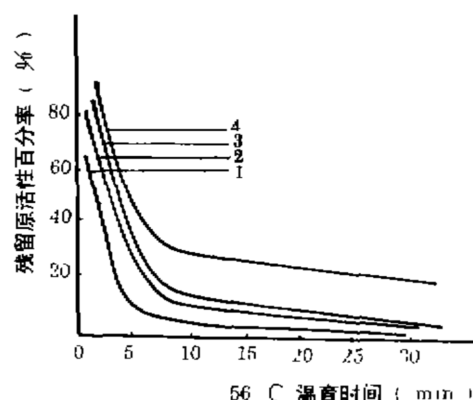


图 3　56℃温育后各纯化同工酶残留原活性百分率曲线图

Fig. 3　Percentage of initial AKP activity remaining in purified isoenzymes after heating at 56℃

1 骨 AKP (bone AKP)；肝 AKP (live AKP)；3 肾 AKP (kindey AKP)；小肠 AKP (intestine AKP)。

表 2　尿素对各同工酶活性抑制百分率(残留活性% ± SD)

Tab.2　Percentage of initinal isoenzymes activity remaining after urea treatment

尿素浓度 (mol/L)	肝同工酶	肾同工酶	骨同工酶	小肠同工酶
0.30	47 ± 3.75	65 ± 4.93	19 ± 1.56	90 ± 7.65
0.58	30 ± 1.63	40 ± 3.50	9 ± 0.93	55 ± 5.43
0.83	23 ± 1.01	28 ± 2.84	6 ± 0.05	29 ± 2.59
2.00	0	2 ± 0.09	0	10 ± 0.09

表 3　组织特异性抑制剂处理后，AKP 同工酶残留活性(平均值 ± SD)

Tab. 3　Percentage of AKP activity remaining after organ-specific inhibitor treatment

抑制剂浓度 (mmol/L)		肝同工酶	肾同工酶	骨同工酶	小肠同工酶
L-苯丙氨酸	10	78 ± 4.90	85 ± 5.30	68 ± 4.85	45 ± 4.20
	20	69 ± 3.32	71 ± 4.01	56 ± 3.65	30 ± 3.21
	40	53 ± 2.58	67 ± 2.58	43 ± 2.42	21 ± 2.02

参 考 文 献

齐顺章, 何诚蓝, 马文彪等, 1988. 鸡血清碱性磷酸酶同工酶谱的分析及其组织来源的鉴定. 畜牧兽医学报, 11(3): 188

陆曼珠, 付斌茵, 郭少元, 1985. 泌乳母牛血清碱性磷酸酶(AKP)的含量与产奶量的相关分析(一). 第五次全国生物化学学术会议论文集汇编(下册): 557

莽克强, 1975. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社. 48.

覃甲仁, 魏 琦, 1986. 广西眼镜王蛇碱性磷酸酶分离纯化与一些性质的研究. 生物化学与生物物理学报, 18(4): 321

Donald W. Moss, 1982. Alkaline phosphtase isoenzymes review. *Clin Chem*, **28**(10): 2007.

Jaszczuk D K, Gelderman H E. 1985. Serum and tissue alkaline phosphateses in pigs. *Animal Blood Groups and Biochemical Genenes*. **16**: 205–216.

Lilian M, Lee Y, Margarel A K, 1985. Electrophoretic method for assesing the normal and pathogical distribution of alkaline phosphase isoenzymes in serum. *Clin Chem*, **21**(8): 1125–1129

Woodroole M N, Dunmas M P, 1989. Evidence for the importance of arginine residues in pig kidney alkaline phosphatase. *Biochem J*, 781, 139.

THE CHARACTERIZATION STUDIES OF CATTLE ALKALINE PHOSPHATASE ISOENZYMES

Qin Daming

(Dept. Biology, Jiangxi Education Institute)

Shen Qiugu Wang Xingjin

(Dept. of Hushendry and Veterinary Science, Jiangxi Agricultural University)

Abstract

Alkaline phosphatase isoenzymes with a specific activity of >40 fold and PAGE pure was isolated from the liver, kidney, bone and intestine of the newborn calf (First, each tissue homogentes was extracted in buffer butanol. Then, the aqueous phase was separated by filtration on Sephadex G-100, DEAE-cellulose column chromatography).

The pure product was studied with respect to its enzymetic activity, electrophoretic mobilities (*Rf* value), heat inhibition, urea inhibition, organ-specific inhibitor treatment, to establish the identities of each isoenzyme. The results demonstrated the following:

1. Isoenzymes *Rf* value: liver isoenzyme > bone isoenzyme > small intestine isoenzyme.

2. Only the bone enzyme was completely inactivated when heated at 56℃ 10 min. Intestial isoenzyme was heat-stable

3. Urea was a strict inhibitor of bone isoenzyme and intestial isoenzyme was urea-stable.

4. Organ-specific inhibitor strictly inhibit activity of intestine AKP.

Key words Alkaline phosphatase isoenzyme, Electrophoretic mobilities, Heat inhibition, Urea inhibition, Organ-specific inhibition